



PENGUKURAN KANDUNGAN DNA BABI DALAM BERBAGAI PRODUK PANGAN DENGAN METODE REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Yusi Luluk Rahmania^{1,*}, Widayat^{1,2}, Tri Winarni Agustini^{1,3}, Meiny Suzery^{1,4}, Ahmad Ni'matullah Albaari^{1,5}

¹Pusat Kajian Halal UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro

²Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro

³Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

⁴Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

⁵Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro

*Email Korespondensi: yusilrm@live.undip.ac.id

Abstrak

Makanan halal merupakan kebutuhan mutlak masyarakat muslim. Indonesia sebagai salah satu Negara dengan mayoritas populasi muslim harus memastikan produk pangan yang beredar dalam masyarakat memiliki jaminan halal. Salah satu upaya untuk menjamin produk makanan halal adalah dilakukan dengan pengujian kandungan babi dalam suatu produk makanan tersebut. Analisis RT-PCR menjadi salah satu alternative pengujian kandungan babi dalam makanan. Disamping pengujian relative cepat dan akurat, sifat DNA yang stabil juga menjadikan RT-PCR sebagai salah satu metode yang efektif untuk menguji produk makanan dengan berbagai macam metode pengolahan. Penelitian ini menguji beberapa produk makanan dengan proses pengolahan yang berbeda. Sampel dilakukan pengujian dalam dua tahapan yaitu ekstraksi DNA dan analisis RT-PCR. Dari hasil pengujian diketahui konsentrasi kemurnian sampel krim matcha jepang sebesar 53,6 ng/ μ l, coklat belanda sebesar 5,2 ng/ μ l, dan sosis babi sebesar 27,9 ng/ μ l. Dari hasil analisis RT-PCR diketahui krim matcha jepang dan coklat belanda terbebas dari DNA babi, sedangkan sosis babi memiliki kandungan DNA babi sebesar 59,87%.

Kata kunci: RT-PCR, DNA Babi, Produk Pangan, Halal

Abstract

Measurement of Pig DNA Content In Various Food Products Using Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method. Halal food is a basic need for the Muslim. Indonesia with a majority Muslim population must ensure that food products distribute in society have halal guarantees. As a guarantee that halal food products need to be tested for the presence of pork contaminant in a food product. RT-PCR analysis is an alternative test for pork contaminant in food. In addition to relatively fast and accurate testing, the stable of DNA also make RT-PCR an effective method for testing food products with a variety of food processing. This study tested several food products with different processes. The samples were tested in two stages, DNA extraction and RT-PCR analysis. From the test results, it is known that the purity concentration of Japanese matcha cream sample is 53.6 ng / μ l, Dutch chocolate is 5.2 ng / μ l, and pork sausage is 27.9 ng / μ l. From RT-PCR analysis results, it was found that Japanese matcha cream and Dutch chocolate were free from pork DNA, while pork sausage had pork DNA content of 59.87%

Keywords: RT-PCR, Pork DNA, Food Product, Halal

PENDAHULUAN

Produk halal merupakan komoditas yang sangat dibutuhkan bagi Indonesia sebagai salah satu Negara dengan populasi mayoritas muslim. Dalam Alquran surat Al Anam Ayat 143 dijelaskan salah satu produk yang dikonsumsi haruslah bebas dari kandungan babi. Pemerintah dalam Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 menjamin kehalalan produk yang dikonsumsi dan digunakan oleh masyarakat. Sejalan dengan upaya pemerintah untuk menjamin ketersediaan bahan pangan kesadaran masyarakat akan makanan halal juga meningkat. Peningkatan kebutuhan makanan halal mendasari peneliti untuk mengembangkan penelitian berbagai metode pengujian halal yang diharapkan dapat memenuhi tuntutan masyarakat akan produk makanan halal.

Dewasa ini pengujian kehalal produk makanan menjadi suatu hal yang mutlak. Pengujian kandungan babi dapat dilakukan dengan beberapa teknik salah satunya HPCL, Elisa, dan IEF. Dalam metode tersebut pengukuran dilakukan pada protein spesifik yang terdapat dalam daging babi. Pengolahan makanan yang saat ini semakin canggih berimbas pada keefektifan metode tersebut dikarenakan protein mudah terdenaturasi sehingga metode ini tidak dapat digunakan pada produk yang sudah mengalami pengolahan.

Real Time PCR merupakan salah satu alternative pengujian kontaminasi babi dalam makanan. Metode RT PCR berfokus dalam identifikasi DNA babi yang terdapat dalam produk makanan. DNA yang bersifat stabil dan tahan panas dapat bertahan pada berbagai jenis pengolahan makanan. Metode pemeriksaan RT PCR memiliki kelebihan dibandingkan metode PCR lainnya yaitu dapat mengidentifikasi dengan sampel yang sedikit, tidak harus melakukan visualisasi, resiko kontaminasi yang kecil, dan dapat melakukan pemeriksaan sampel dengan jumlah banyak sekaligus.

Berdasarkan latar belakang penelitian diatas, dilakukan pengujian identifikasi kandungan DNA babi pada berbagai sampel makanan yang telah mengalami pengolahan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium pusat kajian halal Universitas Diponegoro. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan krim matca jepang, coklat belanda, dan sosis babi. Masing-masing sampel dilakukan pemeriksaan satu kali perulangan menggunakan

RT-PCR dengan melalui dua tahapan yaitu tahapan ekstraksi dan tahapan pengujian menggunakan RT-PCR.

Sampel pertama-tama dipotong kecil-kecil kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan Progenus EasyFast Extraction for Pharmaceutical Products. Tahapan pertama ekstraksi dimulai dengan menimbang sampel sebanyak 20 mg yang dimasukkan kedalam tabung eppendorf 1,5 ml. Sampel yang telah ditimbang, ditambahkan 300 µl lysis buffer kemudian dihomogenisasi dan dipanaskan dalam thermocycler pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah proses pemanasan sampel kemudian ditambahkan 75 µl precipitation buffer dihomogenisasi kembali dan dicentrifuge 12.000 rpm selama 2 menit dalam suhu ruang. Pindahkan supernatan kemudian tambahkan kembali dengan 450 µl binding buffer sentrifuge selama 1 menit 12.000 rpm dalam suhu ruang.

Buang supernatan kemudian lakukan pencucian dengan washing buffer sebanyak dua kali. Tampung endapan kemudian tambahkan elution buffer yang telah dipanaskan sebanyak 50 µl inkubasi selama 5 menit pada suhu 65°C selama 5 menit untuk selanjutnya disentrifuge selama 1 menit pada kecepatan 12.000. Sampel yang sudah diekstraksi kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi DNA yang telah terekstraksi dengan menggunakan spektrofotometri nanodrop.

Tahapan kedua dari proses identifikasi produk halal kemudian adalah proses analisis menggunakan RT-PCR. Proses amplifikasi sampel DNA yang telah terekstraksi dilakukan dengan bantuan TagPro® Quick DNA Extraction Kit. Tambahkan masing-masing 2 µl DNase free water (kontrol negatif), larutan EPC (kontrol positif), dan sampel DNA yang akan diuji pada well/PCR tube yang sudah berisi 23 µl larutan MIX (total 25 µl). Tutup well menggunakan sealing plastic atau caps untuk PCR tube, lalu spin down untuk menurunkan larutan di bawah tube. Masukkan well/PCR tube pada mesin real-time PCR, lalu atur penamaan sampel dan semua parameter yang dibutuhkan. Setting program PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaturan Program RT-PCR untuk Deteksi DNA Babi

Tahap	Waktu	Suhu
<i>Initial PCR activation step</i>	10 menit	95°C
<i>Denaturation</i>	15 detik	95°C
<i>Anneling-extention (FAM dan VIC)</i>	45 detik	60°C
<i>Number of cycles 45</i>		

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Hasil Ekstraksi DNA

Kemurnian DNA merupakan salah satu persyaratan dalam pengujian RT PCR. Untuk mengetahui kemurnian DNA hasil ekstraksi dilakukan pembacaan spektrofotometri nanodrop

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sampel

No	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A260/280	A260/230
1.	Krim Matcha Jepang	53,6	2,62	0,49
2.	Coklat Belanda	5,2	1,17	0,36
3.	Sosis Babi	27,9	2,01	2,12

Dari hasil pembacaan pada A260/280 diperoleh hasil berkisar 1,17 hingga 2,62. Pembacaan pada A260/280 dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi nukleotida dan protein pada DNA hasil ekstraksi Rasio normal kontaminasi protein dan nukleotida yaitu berkisar 1,8-2,0. Dari data yang didapatkan dalam pengukuran sampel, hanya krim coklat belanda yang melebihi batas rasio kontaminasi. Hal tersebut dapat dikarenakan adanya kandungan alkohol, kloroform, dan fenol yang terbawa bersamaan dengan proses ekstraksi. Faktor lain yang dapat berpengaruh adalah adanya protein, RNA, dan pengotor lain yang ikut larut pada saat proses ekstraksi.

Pembacaan kemurnian DNA selanjutnya dilakukan pada A260/230. Pada panjang gelombang ini merupakan serapan maksimal adanya kontaminasi fenol atau residu guanidine. Ratio normal pada A260/230 berkisar antara 2,0-2,2. Dari hasil pembacaan A260/230 dari masing-masing sampel diketahui sampel krim matcha jepang dan coklat belanda tidak berkisar pada rasio normal. Akan tetapi pada beberapa kasus nilai A260/230 yang kurang dari rasio normal tidak berpengaruh terhadap hasil qpcr, sehingga analisis qpcr dapat dilakukan.

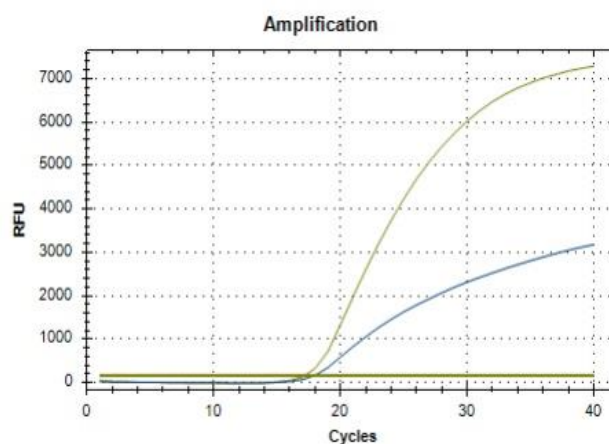
Dari hasil pengujian terhadap hasil ekstraksi DNA yang diperoleh konsentrasi DNA yang terekstraksi bervariasi dari masing-masing produk makanan yang berkisar 5,2 sampai 53,6. Konsentrasi DNA merupakan syarat sampel untuk dapat dilakukan tahapan selanjutnya. Sampel dengan konsentrasi DNA lebih dari 1,0 memenuhi syarat dan dapat dilanjutkan untuk analisis selanjutnya. Dari hasil pengukuran

pada A260/280 dan A260/230. Adapun hasil pemeriksaan sampel penelitian yang dilakukan di Laboratorium Pusat Kajian Halal Universitas Diponegoro diperoleh hasil ekstraksi DNA sebagai berikut.

sampel, semua sampel memenuhi persyaratan untuk dapat dilakukan pengujian RT PCR, hasil konsentrasi tertinggi ada pada sampel krim matcha jepang sedangkan terendah pada coklat belanda.

B. Analisis Real Time PCR

Sampel yang telah diukur kemurnian DNA selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan qpcr. Dari hasil amplifikasi DNA sampel diperoleh kurva sosis babi sebagai berikut.



Gambar 1. Kurva Hasil Amplifikasi DNA pada Sampel Sosis Babi

Dari kurva diatas garis berwarna merah menunjukkan kurva amplifikasi DNA target vertebrata (VIC) sedangkan garis biru menunjukkan kurva amplifikasi DNA target vertebrata. Dari kurva tersebut diketahui bahwa dari hasil amplifikasi pada sampel sosis babi kurva amplifikasi DNA target babi maupun vertebrata menunjukkan hasil yang baik dan valid.

Berdasarkan nilai ct vertebrata dan nilai ct pig dapat diketahui konsentrasi DNA babi. Untuk menentukan konsentrasi DNA babi yang terkandung digunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Presentase DNA Babi (\%)} = 2^{(\text{Ct vertebrate} - \text{Ct pig})} \times 100$$

Hasil pengukuran nilai cq pada masing masing sampel dapat dilihat pada Table 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Nilai Cq pada DNA Sampel

Flour	Target	Sampel	Nilai Cq
FAM	Pig	Kontrol Positif	33,31
FAM	Pig	Krim Matcha Jepang	N/A
FAM	Pig	Coklat Belanda	N/A
FAM	Pig	Sosis Babi	17,84
VIC	Vertebrata	Kontrol Positif	32,48
VIC	Vertebrata	Krim Matcha Jepang	25,82
VIC	Vertebrata	Coklat Belanda	26,08
VIC	Vertebrata	Sosis Babi	17,10

Berdasarkan hasil pengukuran nilai cq pada target pig dengan flour FAM diperoleh kontrol positif sebesar 33,31 dan sosis babi 17,84. Pada sampel krim matcha jepang dan coklat belanda tidak terdeteksi nilai cq pig. Nilai cq pig mengindikasikan adanya DNA babi yang

terdeteksi pada sampel. dari hasil pemeriksaan kontrol positif maupun kontrol negatif menunjukkan hasil yang valid. Dari hasil analisis sampel hanya satu sampel teridentifikasi mengandung DNA babi.

Tabel 4. Konsentrasi DNA Babi yang Teridentifikasi pada masing-masing Sampel

No.	Sampel	Cq Pig	Cq Vertebrata	%DNA Babi
1.	Kontrol Positif	33,31	32,48	56,25
2.	Kontrol Negatif	N/A	N/A	-
3.	Krim Matcha Jepang	N/A	25,82	-
4.	Coklat Belanda	N/A	26,08	-
5.	Sosis Babi	17,84	17,1	59,87

Nilai cq vertebrata merupakan nilai identifikasi adanya DNA vertebrata dalam sampel. dari hasil pemeriksaan nilai cq vertebrata berkisar antara 17,10 hingga 32,48. Berdasarkan nilai cq fam dan cq VIC dapat diketahui konsentrasi DNA babi pada masing masing sampel yang dapat dilihat pada Table 4.

Berdasarkan hasil perhitungan nilai cq diketahui kontrol positif mengandung DNA babi sebesar 56,25% dan sosis babi mengandung DNA babi sebanyak 59,87%. Dari hasil pengujian krim matcha jepang dan coklat belanda memenuhi salah satu persyaratan halal Berdasarkan Fatwa

Majelis Ulama Indonesia Nomor 4 Tahun 2003 tentang Standarisasi Fatwa Halal yang berdasarkan Al Anam Ayat 143 dengan tidak terkandung DNA babi dalam produk makanan tersebut

KESIMPULAN

Identifikasi kandungan babi merupakan suatu hal yang mutlak yang harus dilakukan dalam produk pangan. Pengujian menggunakan RT PCR merupakan salah satu prosedur pengujian kandungan DNA babi yang memiliki sensitifitas dan spesifitas yang tinggi sehingga

mampu mendeteksi DNA babi dengan konsentrasi kecil dalam berbagai produk pangan. Dari beberapa sampel produk makanan yang diuji didapatkan konsentrasi DNA berkisar 5,3 hingga 53,6 ng/ μ l. Dari ketiga sampel tersebut hanya satu sampel memiliki DNA babi yang terkandung yaitu pada sampel sosis babi dengan konsentrasi 59,87%, sedangkan sampel matcha jepang dan coklat belanda tidak terkandung cemaran DNA babi.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriyani E, Fais NL, Muarifah S. 2019. Perkembangan Penelitian Metode Deteksi Kandungan Babi Untuk Menjamin Kehalalan Produk Pangan Olahan. *Journal of Islamic Studies and Humanities*, 4 (1).
- Fatwa Majelis Ulama Indonesia Nomor 4 Tahun 2003 tentang Standarisasi Fatwa Halal.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manuatis T. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Edisi ketiga. New York: Cold Spring Harbour Lab. Press.
- Wahyuni S, Maryam S, Aminah A. 2019. Validasi Metode Analisis Cemaran DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Primer Mitokondria D-Loop22 dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Genelica*, 5(1).
- Undang-Undang No. 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal (Lembaga Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 295 dan Tambahan Lembaga Republik Indonesia Nomor 5604).
- Widayat W, Agustini TW, Suzery M, Al-Baarri AN, Putri SR, dan Kurdianto K. 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesian Journal of Halal*.
- Zilhadia Z, Adhiyanto C, Fajrin AG, Khairunnisa N. 2020. Analisis Cemaran Daging Babi pada Bakso Sapi yang Dijual di Tanjung Priok menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Jurnal Sains Farmasi, dan Klinis*, 7(1).
- Zulfahmi Z. 2015. Deteksi Kontaminan Babi pada Produk Makanan Menggunakan Teknologi DNA Molekuler, *Jurnal Penelitian Sosial Keagamaan*, 18(1).